

訂正有り

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-71837

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月12日

B 01 J 20/22

A 61 M 1/34

B 01 J 20/28

3 1 3

C

6939-4G

7819-4C

Z

6939-4G※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 流体からの化学種の選択的除去

⑯ 特 願 平1-172103

⑰ 出 願 平1(1989)7月5日

優先権主張 ⑱1988年7月6日⑲イギリス(GB)⑳8816066.8

⑳ 発 明 者 アラン ラツセル ト イギリス国、エイチビー9 2イーエイチ、バツキンガム
ムソン シャー、ビーコンスフィールド、アメーシヤム ロード、
135

㉑ 発 明 者 ジョン フランク ハ イギリス国、バツキンガムシャー、ニヤー ビーコンスフ
ツドデイ イールド、ジョーダングズ、ネーザー クラツチーズ(番地
なし)

㉒ 出 願 人 イーストマン コダツ アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、ロチエスター、
ク カンパニー ステイト ストリート 343

㉓ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

流体からの化学種の選択的除去

2. 特許請求の範囲

1. 被除去種のためのリガンドを受取るように
されている不透過性支持体シートを含んでなる流
体からの化学種の選択的除去用素子において、支
持体シートがその表面にリガンドと直接的或いは
間接的に反応性である官能基を有する重合体の層
を付着して有することを特徴とする素子。

2. 流体から化学種の選択的除去方法であって、
その方法は流体をその表面にその化学種に対する
リガンドを有する素子と接触させることよりなり、
その素子とその流体に対して不透過性の支持体シ
ート及び支持体シートの表面に付着した重合体層
を含んでなり、該重合体層がその化学種に対する
リガンドをその表面に共有的に結合して有するこ
とを特徴とする方法。

3. 流体から化学種を選択的に除去するための
装置であって、室を画成する収納部を含んでなり、

その収納部は流体入口及び流体出口手段を有し、
その室は被除去種に対するリガンドを含んでなる
少なくとも1種の素子を保持し、その素子は入口
及び出口に対して装置の使用時において入口を通
して室に入る流体が素子の表面上を通過してから
出口を通過して室を離れるように配置されて、流路
を画成し、その素子が請求項1に記載の素子であ
ることを特徴とする装置。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は流体から化学種を選択的に除去するた
めの方法、素子及び装置に関する。

〔従来技術〕

流体、例えば液体、溶液或いは懸濁液中の化学
種は、流体を除去されるべき種と選択的に相互作
用することのできる部位を有する固体材料と接触
させることにより選択的に除去されて、他の種か
ら分離されることが公知である。各種形態の相互
作用が可能である。例えば、相互作用はイオン交

換或いはキレート化などのように主として化学的であるか、或いはそれは生化学的分子、細胞或いはその他の粒子間のアフィニティ複合体の形成などの生化学的性質のものであってよい。相互作用が可逆的である場合には、特異的に相互作用した種を回収することができる。

相互作用が生ずる固体材料上の部位は、普通リガンドと称される、材料に結合して除去されるべき種と選択的に相互作用することのできる原子、原子群或いは分子よりなる。

一面において、本発明は生特異的(biospecific)アフィニティ反応、特に免疫化学反応を利用する。この場合に、リガンドはもう一つの免疫化学的成分に対して、生特異的なアフィニティを示す免疫化学的成分、例えばタンパク質である。そのような反応の一つの重要なクラスは、抗原(或いはハプテン)とそれに対する抗体の間のものである。モノクローナル抗体の使用は高度に特異的なアフィニティ反応を行わせる。

通常、外来物質(foreign substance)と称され

る抗原の具体例としては、ウィルス、細菌、細菌毒素、炭水化物、ホルモン、薬品及びレクチンなどが挙げられる。

加えて、生物学的に活性な化合物、例えば酵素及びそれらの基質の間のその他の反応は、しばしば十分に特異的であり、分離に用いられるのに十分なアフィニティを有する。加えて、アミノ酸などの小分子は例えばタンパク質と特異的に且つ十分なアフィニティをもって相互作用して、分離の達成を可能にする。

溶液から化学種を除去するための一つの公知の方法は、アフィニティクロマトグラフィカラムの使用を含むものである。このカラムには、それにリガンドが共有的に結合されている多孔性重合体ゲル、例えば架橋アガロースのビーズが充填されている。例えば、そのような重合体ゲルは米国特許 4,330,440号明細書に記載されている。この明細書及びその他の技術からリガンドは活性化重合体、即ちその表面上にリガンドが反応することのできる活性基を有する重合体に共有的に結合でき

ることが知られている。適当な活性基としては、必要に応じて重合体を活性化剤で処理することにより活性化可能な重合体内に生成することができる官能基が挙げられる。例えば、その表面にヒドロキシル基を有するアガロースなどの活性化可能な重合体をカルボニル化剤或いはシアノーゲンブロマイドで処理して、その表面にタンパク質リガンドと反応することのできる官能基を生成することができる。

(発明が解決しようとする課題)

アフィニティクロマトグラフィカラムの使用において、被除去種を含有する溶液がその種がリガンドに付着するようにビーズ内及びビーズ間に通される。この方法には数多くの欠点が付随する。これらの中には、重合体ゲルが取扱いが困難であるという事実が含まれる。更に、ビーズは圧縮性であるのでビーズのカラム中の充填は溶液が通過する際の過剰な背圧につながる。又、重合体ビーズの孔を通しての溶液の拡散は、比較的遅い過程

であり、又ビーズは粒状物質、例えば細胞に対してフィルターとして作用しうる。更にもう一つの欠点は、リガンドが異った接近可能性の程度をもってビーズの多孔性構造内に分布し、従って効率的に用いられないことである。

もう一つの公知の方法においては、被除去化学種を含有する溶液がリガンドが付着している繊維状マトリックス、例えば濾紙、或いは多孔性重合体膜よりなるフィルターに通される。そのようなフィルターは粒状物質がその中を通過する場合に閉塞する傾向を有し、又上記孔拡散及びリガンド利用に付随する欠点も有する。

米国特許 4,551,435号明細書は、免疫特異的に認識可能な物質を全血及び骨髓液などの生物学的液体から選択的に除去する方法を記載している。望ましくない抗原或いは抗体は先ず抗原或いは抗体を対応する相補的抗体或いは抗原と複合化することにより、血液から濾過することができる。そのように形成された免疫複合体を次いで免疫複合体に対してアフィニティを示す吸着剤を通過させ

る。非-免疫特異性因子、例えばC1q よりなるリガンドが固相にカップリングされて吸着剤を与える。

米国特許 4,551,435号明細書に記載されているアフィニティ分離は、流体を非-免疫特異性因子を受取るための反対表面を有する螺旋状に巻かれたシートを含有する室を通すことにより行われる。シートの螺旋状包旋体(helical convolution)はスパーサー手段により分離され、且つ使用時において流体は包旋体内を軸方向或いは円周方向のいずれかに流れる。吸着剤の唯一の具体例は、非-免疫特異性因子C1q が結合されたポリスチレンシートである。

C1q を結合して有するポリスチレンシートの使用に伴う主たる欠点は、C1q がシートに吸着されているが共有的には結合されていないので、脱着しやすいことである。更に、ポリスチレン表面は、その上を通過させられる流体から、その他の生物学的に活性な化合物を吸着し、それらの化合物が追加のリガンドとして作用しうることである。更

に、吸着時に、吸着種の配向に対して調節が行われない結果、リガンドの活性及び/又は特異性が影響を受けることである。この点において、米国特許 4,551,435号明細書において記載される方法及び免疫吸着材料に用いられるリガンドは非-免疫特異性因子であることに限定される。ポリスチレンシートの使用に伴うもう一つの欠点は、それがタンパク質を不活性化しやすい疎水性表面を有することである。

(課題を解決するための手段)

本発明は上記従来技術に関連して説明した問題を解決することを目的とする。

本発明は、被除去種のためのリガンドを受取るようにされている不透過性支持体シートを含んでなる流体からの化学種の選択的除去用素子において、支持体シートがその表面にリガンドと直接的或いは間接的に反応性である官能基を有する重合体の層を付着して有することを特徴とする素子を提供する。特別の実施態様においては、この素子

は更に重合体に共有的に結合したリガンドを含んでなる。

本発明は又、流体から化学種を選択的に除去する方法であって、その方法は流体をその表面にその化学種に対するリガンドを有する素子と接触させることによりなり、その素子がその流体に対して不透過性の支持体シート及び支持体シートの表面に付着又は接着した重合体層を含んでなり、該重合体層がその化学種に対するリガンドをその表面に共有的に結合して有することを特徴とする方法を提供する。

本発明のもう一つの面に従えば、流体から化学種を選択的に除去するための装置であって、室(chamber)を画成する収納部(housing)を含んでなり、その収納部は流体入口及び流体出口手段を有し、その室は被除去種に対するリガンドを含んでなる少なくとも1種の素子を保持し、その素子は入口及び出口に対して装置の使用時において入口を通して室に入る流体が素子の表面上を通過してから出口を通して室を離れるように配置されて、

流路を画成し、その素子が本発明の前記素子であることを特徴とする装置が提供される。

好ましくは、流路は素子上を通過する流体の深さが20~500 μ m、より好ましくは30~200 μ mであるようなものである。

(作 用)

本発明の素子の支持体シートは各種材料から形成することができる。例えば、適当な材料は金属、ガラス、或いは重合体である。シート或いはフィルムに形成することのできる多くの重合体材料が適当であり、例えば、セルロースエーテル或いはエステル例えばセルロースアセテート、ポリエステル例えばポリ(エチレンテレフタレート)、ポリオレフィン例えばポリ(プロピレン)及びポリ(塩化ビニル)などが挙げられる。

支持体の厚みはそれが作られる材料及び素子が用いられる方法に応じて広範に変わってよい。コンパクトさのためには、支持体シートは機械的安定性の要請を尚満足しながらなるべく薄いのが好ま

しい。一例として、支持体シートの厚みは、0.01～0.5 mm、より好ましくは0.05～0.2 mmである。

好ましくは、支持体シートは柔軟性であるのがよい。又支持体シートは平坦であることが好ましい。

重合体層は活性化重合体層、即ちリガンドと直接に反応する官能基を含有する層として存在してよい。或いは又、それは引続き活性化剤による処理によって活性化される未活性化或いは活性化可能重合体として存在してよい。活性化剤は、活性化可能重合体の官能基をリガンドと反応可能な官能基に転換するか或いはそれは活性化可能な重合体の官能基との反応により重合体に結合されるカップリング剤であってよい。

活性化剤の具体例としては、ジビニルスルホン、シアノーゲンブロマイド及びグルタルアルデヒドが挙げられる。

適当な重合体はエチレン性不飽和ヒドロキシ基含有単量体、例えばヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、エチレン性不飽和オキシラン基-

含有単量体、例えばグリシジルアクリレート及びエチレン性不飽和アミド基含有単量体、例えばアクリルアミドなどの単量体から得られる。

液体からの化学種の選択的除去、例えば特定のタンパク質のその混合物の除去を達成するためには重合体は素子上への非-特異的吸着が最小限であるようなものでなければならない。

好ましくは、活性化或いは活性化可能な重合体は、実質的に親水性である。重合体に親水性を与える特に適当な化学基としては、ヒドロキシル基、アミノ基、カルボキシル基及びチオール基が挙げられる。

多孔性材料の使用に伴う問題を最小化するためには、活性化或いは活性化可能重合体層は実質的に非-多孔性である。活性化或いは活性化可能重合体層が多孔性である場合には、それらの孔はリガンド或いは除去されるべき種或いはタンパク質の層中への侵入を排除するのに十分小さいことが好ましい。好ましくは、活性化重合体層は実質的に非-膨潤性であるのがよい。

製造の容易さのためには、活性化可能な或いは活性化重合体は溶媒-被覆可能、例えば水及び/又は有機溶媒中溶液から被覆可能であることが好ましい。このようにして、例えば、スライドホッパー或いは押しホッパーなどを含む通常の被覆機械を用いて効率的に大量の被覆製品を製造することができる。

好ましくは、活性化可能な或いは活性化重合体層は支持体上に連続層を構成するのがよい。

活性化重合体層の厚みは、用いられる特別の重合体によって異なる。好ましい実施態様においては、リガンドと除去されるべき種の間の相互作用が主として層の表面において生ずるので、それはリガンドの支持体シートへの適切な付着又は結合を与えるのに十分に厚いものであればよい。例えば、活性化重合体層の乾燥厚みは5～100 μm、より好ましくは10～50 μmでよい。

活性化重合体と支持体シート間の適正な接着は、含まれるこれらの二つの材料の適当な選択により得られる。或いは又、接着は下敷層の使用或いは

支持体シートを重合体層の塗布前にコロナ放電或いはRFプラズマ処理に付することなどのその他の手段により促進される。

[実施態様]

本発明の一つの好ましい実施態様においては、活性化重合体層が支持体シートの各側に設けられる。

活性化或いは活性化可能な重合体層の表面積を支持体シートの表面積に対して相対的に最大化するために各種方法が用いられる。一つそのような方法において、層は層の表面を各粒子の近傍に持上げる不活性粒状物質を含有する。粒状物質はビーズの形状であってよい。これらの粒子が形成される適当な材料としては重合体及びガラスが挙げられる。

本発明の特に好ましい実施態様において、活性化或いは活性化可能重合体層はスプレー手段として作用する粒状物質を含有する。即ち、粒状物質は本発明の素子がもう一つの素子或いは同一素

子に保持されている同一素子のもう一つの部分を間隔を明けて離すことのできる手段を提供する。粒状物質は重合体被膜上或いは被膜内に化学的に保持されてよい。好ましくは、粒状物質は実質的に均一な形状及び寸法の粒子よりなる。多くの応用のためには、個々の粒子が層内に隣接素子間に実質的に均一な分離距離を与えるように分布していることが望ましい。

前記の如く、粒状物質は例えば重合体或いはガラスのビーズを含む各種形態をとってよい。粒子が与える間隔の程度を決める粒子の寸法は、隣接素子間に必要な分離距離及び活性化重合体層の厚みなどの要因に応じて異なる。全て20~500 μ m、好ましくは20~200 μ mの範囲内に実質的に同一直径を有する不活性材料の実質的に球状のビーズが適当な粒状物質の一例を表わす。

上記粒状スペーサー手段の特に有利な特徴は、その粒状物質を重合体層で被覆することが可能なことである。このようにして、一体的スペーサー手段を有する素子が製造される。単に重合体層が

形成される重合体或いは単量体及び粒状物質を含んでなる均質な被覆組成物を調製することにより、粒子が被覆層上に均一に分布されて均一な分離を確実にする。

基板の表面に接着したビーズその他の適当な粒状物質のスペーサー手段の使用は新規であると考えられる。

一般的に、素子が流体、例えば水性溶液或いは懸濁液から化学種を除去するために用いることができる前に、その種に対するリガンドが素子の活性化重合体層に共有的に結合される。本発明の好ましい実施態様において重合体層が実質的に非多孔性である場合には、リガンドは主として層の表面上に付着される。

流体から化学種を除去する方法は、本発明の装置において行われる。この装置に含まれる本発明の素子は、多くの異った方法で形成されてよい。

例えば、これらの装置は各素子が隣接素子からスペーサー手段により分離されている複数の対面立体配置の素子よりなるものである。

この装置の一つの好ましい実施態様において、素子はコイルの包旋体がスペーサー手段により分離されており、且つ画成流路がそれらの包旋体を通る軸方向にあるコイル状である。

もう一つの好ましい実施態様において、素子はコイルの包旋体がスペーサー手段により分離されており、且つ画成流路がそれらの包旋体を通る円周方向にあるコイル状である。

好ましくは、スペーサー手段は、素子の隣接表面間に実質的に一定の分離距離を与えるのがよい。分離距離は20~500 μ m、好ましくは30~200 μ mである。

上記の如く、スペーサー手段は素子と一体的であってよい。或いは又、スペーサー手段は、分離され、例えば、流体を装置内を通過させるテープ、棒或いはメッシュ状構造の形態をとってよい。

スペーサー手段が実質的に均一な分離距離を与えることが重要でない場合には、スペーサー手段は素子自体であってよい。例えば、素子を波形にし、その隣接部分或いは隣接した別々の素子をそ

の素子の部分のみ或いは複数の素子が隣接するように配置してよい。

本発明の一つの面において、この素子或いは装置は、生特異的アフィニティ反応を利用することにより、生物学的に活性な分子をその混合物から除去するために用いられる。この場合にリガンドは生特異的リガンド、例えばタンパク質であり、及び活性化重合体はそれを介してタンパク質が重合体に共有的に結合することのできる適当な官能基を含んでなる。そのような基は周知であり、ヒドロキシル、アミン及びチオール基などが挙げられる。タンパク質リガンドの一例はタンパク質Aである。

多くの生特異的アフィニティ反応が公知であり、特別の具体例は、抗原及びそれに対して産生された抗体の反応により表わされるものである。利用可能な広範囲のモノクローナル抗体を用いて現在では広範囲の高度に特異的なアフィニティ反応を行うことが可能である。本発明において用いられた特別の抗体リガンドはラット抗マウスカップ

一類抗体である。

用いられるその他のリガンドとしては、トリアゾン色素などの反応性色素、例えばProcion MX-R及びCibacron Blue F3G-Aなどが挙げられる。

本発明の装置を用いて得られる利点は、それが粒状物質、例えば細胞を含有する流体を取扱うことができるという事実であり、従って、現在利用可能な装置に比べてそのような粒状物質により閉塞され難いことが挙げられる。更に、この装置は自己含有性であり、使用が便利であり且つ必要に応じてその処分がそれを一回使用にのみ通したものにできる。これは、病原体、ウィルス類、DNA生成物などの物質を含有する材料を取扱う場合或いは処理液体を患者に再注入する場合(例、骨髓液パージ)には、重要な考慮である。加えて、この装置は容易に予備包装され、及び必要に応じて予備殺菌される。

この装置はその中に含まれる素子の性質に関して異った形態で供給されうる。例えば重合体層は活性可能な形態であり得、従って使用前に活性化

剤による処理及び引続くリガンド結合のための処理を必要とする。或いは又、重合体層は、既に活性化されて単にリガンドを結合するための処理を必要とするものでありうる。最後に、この装置は素子にリガンドを結合して供給されることもできる。

本発明の素子及び装置を第1図乃至第4図(実物大でない)に基づき更に説明する。

第1図は本発明の素子の断面図を示す。この素子は活性化可能な或いは活性化重合体11の層で被覆された支持体シート10よりなる。層11内に導入されたスパーサービーズ12が支持体10に接着されている。

第2図は本発明の装置の外部の斜視図である。収納部20はプラスチック材料例えばポリプロピレンから成形されてよいものが示されている。収納部20は蓋22が取り付けられている円筒体部分21よりなる。蓋には流体入口管23が設けられており、及び本体部分には、流体出口管24が設けられている。

第3図及び第4図は、それぞれ第2図の線2-2及び3-3に沿ってとられた断面図である。

蓋22はそれを通して流体が収納部20により画成される室に通される軸通路25を含有する。蓋22の内部表面には流体の流れをそれが室に入る際に広げるための通路25から放射状に延在する溝26が設けられている。この室は本発明の素子のコイル27を含有する。第1図に示されたタイプの素子が円筒状芯28の上に螺旋状に巻付けられている。コイルの外部巻付きは、コイルの外部表面と同じ広さの接着剤テープ29によりコイルの本体に結合されており、コイルと収納部20の内部表面間に耐流体シールを与える。

コイルは、一端における蓋22と他端における室の円形壁に対して保持されているポリプロピレン円盤30との間において室を満たしている。コイルに面した円盤の表面には円盤内を軸方向に走る中心通路から放射状に延在する溝31が設けられている。この通路は、収納部及び出口管24の末端壁を通過している通路32と連通している。

この装置を使用時には、入口を通過して室に入る流体は、コイルの包旋体を通して軸方向に通過してから出口を通過して室を離れる。

図面特にコイルの表示は概略的であることが強調される。実際には素子の全体の厚みは、200mmのオーダーである。コイルは約12mmの直径を有する中心円筒状芯上に螺旋状に巻付けられた35mm幅、11m長さの帯状のそのような素子から製造された。そのようなコイルは80mmの全長及び70mmの外径を有する示されたタイプの装置内に含有された。明らかにコイルは縮尺作図では適切に示すことの不可能な多くの近接した包旋体よりなるものである。

実施例

本発明を更に以下の具体例により説明する。

例1

エタノール中に10% w/wポリヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)及び5% w/w重合体の量でグルタルアルデヒド架橋剤を含有する被覆溶液を調製した。

押出しホッパーを用いて0.08mmの厚さを有する

コロナ放電処理ポリエチレンテレフタレートシート
の一方の側に溶液を被覆した。溶液の流速は3
m/分の被覆速度で100 μ mの涎潤堆積層を与え
るように調整した。この被膜を室温において被覆機
械内で約20分間乾燥し、90℃で約2日間硬化させ
た。

この被覆操作を又溶液が50 μ mの直径を有するシリカ被覆ポリスチレンスパーサービーズを含有するように変更してシートの他方の側にも行い、乾燥製品中に約200ビーズ/cm²の密度を得た。

架橋重合体層の乾燥厚みは10~20 μ mであり、それは最少の水中の膨潤性を有した。

そのように製造されたシートを各々35mm幅の11mの長さのスリットした。

そのような細片を清浄な条件下に中心芯上にスプールし、コイル化された素子を第2～4図に示されるような装置に挿入した。

莖置を乾燥状態で秤量し、次いで残存架橋剤を除去するために「ミリボワ」品質の水で数時間洗い流し、次いで再秤量した。質量の差は莖置の充

填容積が約27mlであることを示した（即ち、乾燥装置が保持する液体の容量）。

Procion-Blue MXR 色素を次いで装置内に 100 ml の、1 g の色素、30 ml 4M NaCl、0.2 ml 10M NaOH を含有する溶液を、40℃で2時間、10 ml/分の流速で循環させることにより重合体層にカップリングさせた。装置を次いで水で2時間洗い流した。それを次いで 600 ml の 0.2 M ホスフェート / 1 M NaCl 溶液、次いで再び水で及び最後に 0.14M PBS で洗い流した。

次いで50mlの新たに解凍した血清を20ml/分で装置内を2時間時々流れを止めて血清を重合体層間に良好な接触を与えるようにしながら循環させることにより、アルブミンをウサギ血清から分離した。

装置を次いで洗浄液が280nmにおけるUV吸光度がゼロになるまでPBSで洗い流した。

60 ml の 0.005 M Tris/HCl / 0.2 M NaSCN を 10 ml / 分で装置を通過させて、6 μ g のアルブミンを溶出し、更に 20 ml を 10 ml / 分で 1/2 時間装置を循

層させて更に6層のアルブミンを溶出した。

タンパク質回収率は、280nm における光学吸光度により求め、電気泳動を用いて回収アルブミンを固定した。

51 2

1. ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート-
 コーメチルメタクリレート-コーメタクリル酸)
 -コー3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルメタ
 クリレート(16:1:1:2)の合成

冷却器及び窒素入口を備えた1ℓの三つ口丸底フラスコに下記のものを充填した：

2-ヒドロキシエチルメタクリレート (0.48モル)	62.45 g
メチルメタクリレート (0.03モル)	3.00 g
メタクリル酸 (0.03モル)	2.55 g
3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル メタクリレート (0.06モル)	10.72 g
p-トルエンスルホン酸一水和物	2.10 g
ビス(4-ター、ブチルシクロヘキシ ル)パーオキシジカーボネート	0.79 g
エタノール/メチルセロソルブ (9:1 v/v)	250 ml

溶液を50℃で17時間攪拌した。窒素をこの時間中溶液中に吹込んだ。重合体を過剰ジエチルエー

テル中に沈澱させることにより回収し、デシケーター内で乾燥させた。(収量=74.9 g)。

2 重合体の被覆

100%ジメチルホルムアミド中10% w/wの上記重合体プラス10% w/wテトラブチルアンモニウムヒドロキシド/重合体よりなる被覆溶液を調製した。50 μ mシリカ被覆スチレンビーズを溶液内にスパーサービーズとして懸濁状態で導入した。

溶液をコロナ放電処理ポリエチレンテレフタレートシートの一側の側に被覆して100 μ mの湿潤堆積層厚みを与えた。被膜を90℃で約20分間乾燥した。被覆溶液がスパーサービーズを含有しない以外は同様にしてシートの他方の側を被覆した。

この被膜は水、塩溶液、エタノール、アセトン及びジメチルホルムアミド中で安定であり、有効な架橋が行われたことを示した。

被覆シートを約15m長及び35mm幅の細片にスリットした。細片を清浄な条件下に中心芯にスプールし、コイル化された素子をポリプロピレンで作られた第2図～第4図に示されるような装置に挿入

入した。コイル化された素子を装置本体中に挿入後、蓋を超音波溶接により取付けた。

この装置を「ミリボワ」品質の水で洗い流した。

3. クロマトグラフィ用途

Cibacron Blue F3G-A色素を次の操作に従ってコイル化された素子にカップリングさせた。65 mlの水及び10 mlの塩化ナトリウム溶液(4 M)に溶解させた2.4 gの色素を、予め洗い流した装置に60 ml/分で30分間ポンプ送りした。装置を室温で90分間放置して色素を重合体表面に吸着させた。1.25 mlの水酸化ナトリウム溶液(10 M)を色素溶液に添加し、それを12より大きいpHにおいて30分間装置内を循環させた。装置の入口及び出口を密封し、それをシェーカー内で25℃において2日間保存した。

色素が280nmにおける分光吸収により検出されなくなるまで、水で装置を60 ml/分で洗い流した。未カップリング色素はいずれも被覆表面から塩化ナトリウム(1 M)/エチルアルコール(25%)溶液で洗い流すことにより除去された。

Cibacron F3G-Aの代りにProcion MX-R色素を用いても示された。

例 3

重合体-被覆ポリエチレンテレフタレートシートを100 µmシリカ被覆スチレンビーズを50 µmの大きさのビーズの代りに用いた以外は例2のパート1及び2と同様にして調製した。

被覆重合体の試料は0.5 M重炭酸ナトリウム中4%ジビニルスルホン溶液pH11で処理することにより活性化した。0.8 mg/mlのラット抗-マウスK-類モノクローナル抗体をpH8において0.1 M重炭酸ナトリウム、0.5 M塩化ナトリウム溶液中の活性化重合体被膜にカップリングさせた。ラット抗-マウスK-類抗体はSera-lab(クローンOX-20、コードNAS 202C)から得られた腹水から精製した。

5%ウシ胎児血清を補給されたRPMI 1640培地(共にFlow Laboratories製)中で生育したヒトT-細胞白血病のJurkat細胞(J. Experimental Medicine 152: 1709, 1980; Gillis, S., 及び

この装置を、200 mlの0.05 Mリン酸緩衝液(pH7)で50 ml/分で洗い流した。50 mlの未処理ウサギ血清を30 ml/分で装置中に負荷した。装置を出る最初の30 mlの溶液を廃棄し、残存溶液を同一流速で30分間装置内を循環させた。次いでポンプを切り、装置を更に30分間放置した。0.05 Mリン酸緩衝液で洗浄液の280nmのUV吸光度がゼロになるまで、60 ml/分で装置を洗い流した。

選ばれた溶液を用いて30 ml/分で溶出を行い、最初の六つの画分を集めた。溶液を30 ml/分で10分間循環させ、第七番目の画分を集めた。流速を60 ml/分までに増加し、更に2×20 mlの画分を集めた。

数多くの操作に溶出液として0.2 M NaSCN/0.05 M Tris/HCl(pH8)を用いて3~11 mgのアルブミンを得た。

タンパク質回収率は、280nmにおける光学吸光度により求め、電気泳動を用いて回収タンパク質を同定した。

アルブミン回収率は、又本例の操作に従って、

Watson, J)を洗浄して培地を除去し、リン酸緩衝塩水に再懸濁させた(PBS組成: 0.15 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH7.2)。細胞の生育可能性はトリパンブルー排除法により判断して85%より大きかった。

総数 3.1×10^7 個のJurkat細胞(5.2×10^6 細胞/ml)をT細胞表面抗原CD2に対するマウスモノクローナル抗体で標識化した。この抗体はBecton Dickinson Ltd.から得た(Anti-Leu-5b、カタログ番号7590)。この抗体は0.5 µg抗体/10⁷個の細胞の割合で細胞に添加した。細胞及び抗体を一緒にインキュベートし、その後、過剰の抗体を遠心分離により除去し、標識化細胞をPBSに再懸濁した。

OX-20をカップリングさせた重合体被膜を標識化細胞の懸濁液と共にインキュベートした。これらの被膜を引続きPBSで洗浄し、顕微鏡で検査した。これらの被膜は高密度での結合細胞の良好な均一の被覆を示した。

比較のために、被覆を非-抗体標識化細胞と共

にインキュベートした。引続く顕微鏡検査は実質的に細胞が重合体に結合しなかったことを示した。

発明の効果

本発明はアフィニティクロマトグラフィーの幾つかの従来技術方法の目詰り及び過度の背圧を回避する。また前記したリガンド脱着の問題は、本発明に従えば、サブリガンドが不透過性シートに共有結合的に結合しているので最小になる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の好ましい素子の断面図である。

第2図は本発明を導入する装置の外部の斜視図である。

第3図は第2図の線2-2に沿った縦断面図である。及び

第4図は第2図の線3-3に沿った横断面図である。

FIG. 1.

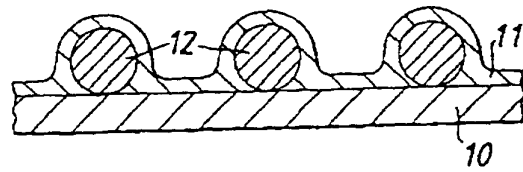


FIG. 2.

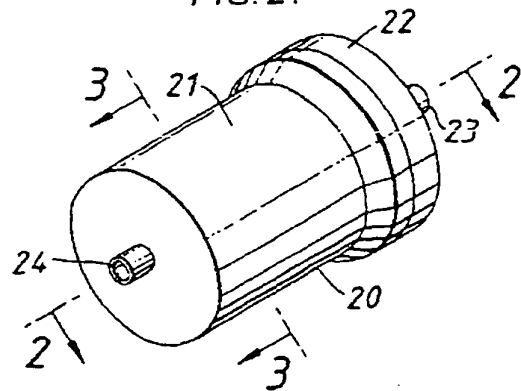


FIG. 3.

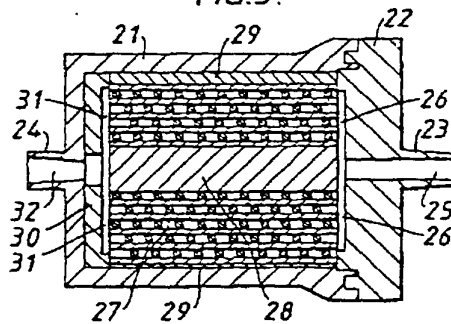
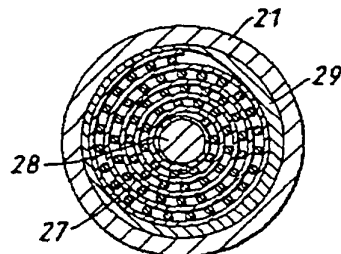


FIG. 4.



第1頁の続き

特開平2-71837(10)

⑤Int. Cl. 3

識別記号

庁内整理番号

// B 01 D 15/08
G 01 N 30/48
33/543

R
P

6953-4D
7621-2G
7906-2G

優先権主張

⑥1989年1月6日⑥イギリス(CB)⑥8900241.4

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第2部門第1区分

【発行日】平成9年(1997)5月13日

【公開番号】特開平2-71837

【公開日】平成2年(1990)3月12日

【年通号数】公開特許公報2-719

【出願番号】特願平1-172103

【国際特許分類第6版】

B01J 20/22

A61M 1/36 545

B01D 15/08

B01J 20/28

G01N 33/543 521

【F1】

B01J 20/22 C 9538-4D

A61M 1/36 545 7421-4C

B01D 15/08 9344-4D

B01J 20/28 Z 9538-4D

G01N 33/543 521 8310-2J

手 続 補 正 書

平成8年6月3日

特許庁長官 前 川 佑 二 殿

1. 事件の表示

平成1年特許第172103号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 イーストマン コダック カンパニー

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁護士(7751) 石 田 敏

4. 補正の対象

明細書の「図面の簡単な説明」の欄

5. 補正の内容

明細書第31頁最下行の下に次の記載を加える。

【符号の説明】

10…支持体シート

11…活性化合物

12…スパーサービーズ

20…収納部

21…円筒体部分

22…蓋

23…複体入口管

24…液体出口管

25…輸送路

26…溝

27…コイル

28…円筒状芯

29…換気剤テープ

30…ポリプロピレン円盤

31…蓋

32…通路

以 上

